Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. H.P.R. Seeliger

BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM VERGLEICH VON METHODEN ZUR KEIMZAHLBESTIMMUNG IN HARNPROBEN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Heidrun Rothenbach
aus Aschaffenburg

Würzburg 1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543520_0089

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. H.P.R. Seeliger

BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM VERGLEICH VON METHODEN ZUR KEIMZAHLBESTIMMUNG IN HARNPROBEN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Heidrun Rothenbach
aus Aschaffenburg

Würzburg 1970

Referent: Professor Dr. phil. W. Döll

Korreferent: Professor Dr. med. H. P. R. Seeliger

Tag der Promotion :

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1 Untersuchte Proben	4
2.2 Bakteriologische Diagnostik	5
2.3 Keimzählungsmethoden	5
Verfahren A: Keimzählung in der HELBER-Kammer	5
Verfahren B: Keimzählung im Oberflächen-Kulturverfahren mittels "Flooding"	7
Verfahren C: Keimzählung mittels 10-µl-Pipette, System "Marburg"	7
Verfahren D: Keimzählung mittels kalibrierter Platinösen	7
3. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen	8
3.1 Beurteilung der Grampräparate	8
3.2 Untersuchungsergebnisse	9
3.21 Ergebnisse der verschiedenen kulturellen Verfahren	13
3.22 Beurteilung der quantitativen Keimzahlbestimmungen	14
3.3 Unterschiede in der Reproduzierbarkeit und der Keimzahl-Ausbeute bei 3 Ausstreich-Verfahren (Methoden B, C und D)	18
4. Diskussion	21
5. Zusammenfassung	28
Literaturverzeichnis	I - VI

1. EINLEITUNG

Die Symptome entzündlicher Erkrankungen im Bereich der Niere und der ableitenden Harnwege sowie ihre primär und sekundär möglichen Folgeerscheinungen nehmen bei den infektiösen Erkrankungen des Menschen einen breiten Raum ein. FUCHS (20) vertritt die Auffassung, "daß fast jede (über 80 %) unspezifische Entzündung der harnableitenden Organe die Niere in den Krankheitsprozeß miteinbezieht und an der pyelorenalen Grenze sicher nicht halt macht".

Als häufigste Nierenerkrankung spielt die chronische Pyelonephritis eine besondere Rolle. Frauen erkranken an ihr meist zwischen dem 45. und 65., Männer vorwiegend zwischen dem 65. und 85. Lebensjahr. Die Pyelonephritis gehört zu den häufigsten Erkrankungen im Säuglings- und Kleinkindesalter (22/23/60), und hat für Vorsorgeuntersuchungen von Schwangeren differentialdiagnostisch große Bedeutung (4/30/31/43/55).

Durch frühzeitiges Erkennen und langfristige, gezielte Chemotherapie kann das Fortschreiten von Nierenerkrankungen und Harnwegsinfektionen zwar nicht immer beherrscht, zumindest aber aufgehalten werden (18/25/28/38/44/52/54/63/64).

Da Bakteriurie und/oder Pyurie als verhältnismäßig sichere Symptome jeder Harnwegsinfektion gelten (10/33/57), ist ihr Nachweis für die diagnostische Beurteilung wichtig. Vor allem das Vorhandensein von Bakterien im frisch gelassenen Morgenurin steht in charakteristischer Korrelation zum Ablauf von Nierenerkrankungen (2); oft ist sogar "eine Bakteriurie das einzige objektivierbare Kriterium der chronischen Form oder der pathologisch-anatomisch noch nicht faßbaren Vorstufen einer Pyelonephritis" (20).

Bakteriologische Laboratoriumsuntersuchungen bieten die Möglichkeit, Infektionen schon im Beginn aufzudecken und manifeste Erkrankungen nach Absetzen der Chemotherapie zu kontrollieren, ohne dabei den Patienten durch die Untersuchungstechnik besonders zu belasten.

Um eine möglichst große diagnostische Sicherheit zu erzielen, bedarf es für die Urinkultur bestimmter Voraussetzungen:

a) Urinentnahme unter sterilen Kautelen, z. B. Verwendung ausschließlich von Katheter- und Mittelstrahlurinen.
b) Kurzfristige Aufbewahrung der Urinproben, wobei die Temperatur + 4°C betragen sollte (6/36/44/53).
c) Wahl optimaler bakteriologischer Kulturverfahren.

Bei der bakteriologischen Kontrolle von Urinproben wird in der Regel zunächst ein mikroskopischer Befund erhoben; vorhandene Keime werden kulturell nachgewiesen und differenziert, und schließlich wird ihre Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika bestimmt. Seit einigen Jahren gehören quantitative Keimzahl-Bestimmungen ebenfalls zu einer vollständigen, bakteriologischen Harnanalyse, da erst die Keimzahl pro ml Urin eine gewisse Unterscheidung zwischen eigentlichen "Erregerkeimen" und "Kontaminationskeimen" ermöglicht (10/34/36/37).

Seit MARPLE und KASS 1955 die Keimzahl von Harnproben für die klinische Beurteilung als richtungsweisend erklärten (38), hat sich der Schwerpunkt bakteriologischer Harnanalysen mehr auf quantitative und semiquantitative Verfahren verlagert. Von KASS stammt der Begriff einer "signifikanten Bakteriurie", womit eine Zahl von 10^5 Keimen pro ml Morgenurin als Schwellenwert eines entzündlichen Prozesses festgelegt wurde. Ein solcher Befund würde bedeuten, daß 10^5 und mehr Keime pro ml Urin auf eine floride Pyelonephritis hinweisen, während Keimzahlen zwischen 10^4 und 10^5 Keimen/ml nur als verdächtig gelten und weitere Kontrolluntersuchungen erfordern, da es sich in diesem Fall um ein beginnendes oder abklingendes Geschehen handeln könnte. Keimzahlen unter 10^3 Keime/ml können Ausdruck der Latenzphase einer Pyelonephritis sein (20) oder weisen auf Sekundärverunreinigungen hin, die für die diagnostische und klinische Beurteilung von Harnwegsinfektionen ohne Bedeutung sind.

Neuerdings differenziert man auch zwischen Keimzahlen von Mittelstrahlurinen und solchen aus Katheterurinen (60). Hierzu hat man den bedeutsamen Grenzwert für Keime aus Mittelstrahlurinen mit 10^5 pro ml, für Bakterien-

kolonien, die sich aus Katheterurinen anzüchten lassen, dagegen mit 10^3 pro ml beziffert. Die Indikation zu einer suprapubischen Blasenpunktion ist nach FUCHS (20) nur bei Harnverhaltung oder bei schwierigen bakteriologischen Fragestellungen gegeben, und dürfte sich als Routinemethode der Harnentnahme für bakteriologische Keimzahlenbestimmungen wohl kaum durchsetzen (60).

Von einer quantitativen Keimzahl-Bestimmungsmethode ist zu fordern, daß sie auch bei niederen Keimzahlen noch reproduzierbare Werte liefert (60/64).

Nachfolgende Zusammenfassung gibt einen Überblick über verschiedene Möglichkeiten quantitativer und semiquantitativer Keimzählungen:

I. Mikroskopische Verfahren (z. B. im Grampräparat (10/14/17/28) oder in einer Zählkammer (15/23/47/48))

II. Verfahren auf kultureller Basis
   a) quantitativ:
      1. Plattenguß-Verfahren (37)
      2. Membranfilter-Verfahren (62)
      3. Flooding-Technik (36)
      4. Ausstreich-Verfahren mittels geeichter Pipetten (29) und Ösen (49)
   b) semiquantiativ:
      1. Ausstreichmethoden(z. B. W-Strich nach HIRSCH, Kreuzstrich nach GOULD (37/38))
      2. Bacto-Strip-Verfahren (20)
      3. Hochschicht-Agarröhrchen nach LODENKÄMPER (39)
      4. "Uricult"-Tests (R) (20/50/60/65/66)
      5. Zählung mit "plastic spoons" nach BENNER (3)

III. Verfahren auf enzymatischer Basis
   a) TTC-Test (Prüfung der Reduktion von Triphenyl-tetrazolium-chlorid) (6/12/37/53/59/64/27)
   b) Griess Reagenz, Nitrit-Teststreifen (Prüfung der Nitratreduktion) (6/19/35/36/41)

IV. Verfahren auf serologischer Basis (9/10/17/37).

In der vorliegenden Arbeit wurden bei Keimzählungen in Harnproben verschiedene Methoden miteinander verglichen. Dabei sollen die folgenden Punkte als Fragestellung beantwortet werden:

1. Sind die Ergebnisse der Keimzahl-Bestimmungen bei den einzelnen Verfahren miteinander vergleichbar, die Befunde bei mehrfacher Untersuchung einer Urinprobe reproduzierbar?
2. Können auch in niederen Keimzahl-Bereichen noch reproduzierbare Werte angegeben werden?
3. Wie ist der technische und arbeitsmäßige Aufwand zu beurteilen?
4. Welche Methode eignet sich am besten für die Routine in einem bakteriologischen Laboratorium mittlerer Größe?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchte Harnproben:

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten 230 Urinproben stammen aus der Urologischen Ambulanz der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg [1] und wurden ohne besondere Auswahl in der Reihenfolge ihres Einganges registriert und untersucht. Alle Proben wurden sogleich nach ihrer Abnahme auf + 4°C gekühlt und innerhalb von vier Stunden verarbeitet. Zwischen den einzelnen Arbeitsgängen wurden die Proben im Kühlschrank aufbewahrt. 100 Harnproben mit positivem Bakterienbefund wurden für eine graphische Auswertung herangezogen, um Korrelation und Regression der Verfahren untereinander zu prüfen (vgl. Abb. 1, 2 und 3). Die Katheterurine (Anzahl 30) stammen vorwiegend von weiblichen, die Mittelstrahlurine (Anzahl 70) ausschließlich von männlichen Patienten.

---

1) Herrn Privatdozent Dr. Frohmüller (Chirurgische Universitätsklinik, Direktor Prof. Dr. Kern) bin ich für sein freundliches Entgegenkommen dankbar.

2.2 Bakteriologische Diagnostik:

2.21 Im Varia-Laboratorium des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg erfolgte der qualitativ-kulturelle Bakteriennachweis. Die Urinproben wurden hierzu in üblicher bakteriologischer Technik (vgl. HABS/SEELIGER (24)) auf Blut- und ENDO-Nährböden bebrütet, außerdem in Thioglykolat-Bouillon angereichert. Anschließend wurden die angewachsenen Kolonien aufgrund des mikroskopischen und kulturmorphologischen Befundes sowie anhand biochemischer Merkmale in der sogenannten "Bunten Reihe " differenziert. - Zur Bestimmung der Antibiotika-Resistenz wurden Blättchen-Diffusionstests angelegt.

2.22 Von allen Urinproben sind im Rahmen der eigenen Untersuchungen Grampräparate angefertigt worden. Um vergleichbare Bedingungen zu erhalten, wurden etwa 10 µl des aufgeschüttelten, nicht zentrifugierten Nativ-Urins auf 2 cm^2 eines Objektträgers verteilt und nach der Färbung bei 800facher Vergrößerung circa 2 min mikroskopiert. Die Befundangabe beschränkt sich dabei auf den Bakteriennachweis ohne qualitative Differenzierungsmerkmale.

2.3 Folgende vier Methoden wurden für die quantitativ-bakteriologischen Untersuchungen von Urinproben ausgewählt:

A. Mikroskopische Keimzählung in der HELBER-Kammer (15)
B. "Flooding"-Verfahren (36)
C. Ausstrei ch-Verfahren mittels Pipettierautomat "System Marburg", Methode nach HUSSEL (29)
D. Ausstreich-Verfahren mittels geeichter Platinösen, Methode nach RINGELMANN, HADDING u. BITTERMANN (49).

A. Keimzählung in der HELBER-Kammer:

Da die Kantenlänge der Raster 50 µ beträgt, und die Kammer 20 µ hoch ist, ist die Keimzahl pro ml durch Multiplikation der pro Raster gezählten Zellen mit dem Faktor 2 x 10^7 zu errechnen. Die untere Grenze der in der HELBER-Kammer bestimmbaren Keimzahl pro ml Urin beträgt 1 x 10^6 Keime/ml. Die Kammer ist daher für Keimzahlbestimmungen in Harnproben im klinisch

interessanten Bereich um 10^5 Keime pro ml nicht verwendbar. Sie kann jedoch zur Vorbestimmung von Verdünnungsstufen dichter Bakteriensuspensionen benutzt werden (vgl. DÖLL u. REICHEL (15)). Nach Beschichten der Zählkammer mit aufgeschütteltem, nicht sedimentierten Nativurin wurde bei 400facher Vergrößerung mikroskopiert. Ausgezählt wurden 5 Quadrate mit 4 diagonal liegenden Rastern, pro Kammer also 20 Rastereinheiten. Die auf der rechten und oberen Begrenzung der Raster liegenden Keime wurden nicht mitgezählt. Betrug die Keimzahl pro Raster mehr als 15 Keime, wurde anstelle des Nativurins die nächst höhere Verdünnungsstufe gewählt.

B. Keimzählung im Oberflächen-Kulturverfahren mittels "Flooding":

Die aufgeschüttelten, nicht zentrifugierten Urinproben wurden in 10er-Verdünnungsstufen bis 1 : 10^6 mit steriler 0,85 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Zur Vermeidung von Pipettierfehlern wurden die Pipetten bei den einzelnen Verdünnungsschritten jeweils gewechselt. Aus jedem Röhrchen der Verdünnungsreihe wurden 0,5 ml auf vorgetrocknete Blutagarplatten [1] übertragen und durch Drehbewegung gleichmäßig auf der der Oberfläche verteilt (=Flooding). Nach einer Bebrütungszeit von 20 - 24 h (bei 37°C) konnten die angewachsenen Kolonien ausgezählt werden. Hierbei wurden nur Platten mit 10 - 200 Kolonien pro Platte berücksichtigt. Aus der Anzahl der Kolonien, der Verdünnungsstufe und dem vorgelegten Volumen (= 0,5 ml) läßt sich die Keimzahl pro ml der untersuchten Harnprobe annähernd errechnen. Zur Erfassung des Keimzahlbereiches bis um 10^5 pro ml sind bei Keimzahlbestimmungen in der bakteriologischen Praxis wenigstens 4 Zählplatten (aus Nativurin sowie aus den Verdünnungen 10^{-1} -10^{-3}) anzulegen.

C. Keimzählung im Oberflächen-Kulturverfahren mittels 10-µl-Pipettierautomat, System Marburg:

Die Keimzahl wurde in Anlehnung an HUSSEL (29) mit dem Pipettierautomat, System Marburg (10 µl)[2] durchgeführt. Abweichend von der beschriebenen

---

1) Zusammensetzung des Blutagar-Nährbodens:
1000 ml Aqua. dest., 25 g Pepton aus Fleisch, 5 g NaCl, 30 ml Menschenblut, 20 g Agar-Agar.

2) Hersteller: Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg.

Methodik (29) wurden in der vorliegenden Arbeit Blutagarplatten [1] verwendet.

Prinzip: Mit dem Pipettierautomaten, der nach Art einer Kolbenpumpe konstruiert ist, werden 10 µl der Urinprobe auf einen Nährboden übertragen und schnell und gleichmäßig mit einer Öse verteilt. Nach Bebrütung (24 h, bei 37°C) werden die angewachsenen Kolonien ausgezählt, Die annähernde Keimzahl pro ml der untersuchten Probe errechnet sich durch Multiplikation der Zahl angewachsener Kolonien mit dem Faktor 10^2.

D. Keimzählung im Oberflächen-Kulturverfahren mittels kalibrierten Platinösen:

Die Keimzählung wurde in Anlehnung an RINGELMANN, HADDING und BITTERMANN (49) mit kalibrierten Platinösen [2], die ein Fassungsvermögen von 1 bzw. 10 µl aufweisen, durchgeführt. Abweichend von der von RINGELMANN und Mitarb. (49) beschriebenen Methode wurden Blutagarplatten benutzt.

Prinzip: Die zu untersuchende Harnprobe wird mit der 1 µl-und 10 µl-Öse auf je eine Hälfte einer Blutagarplatte schnell und gleichmäßig verteilt. Nach der Bebrütung (24 h, bei 37°C) werden die angewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Keimzahl pro ml errechnet sich durch Multiplikation der Zahl angewachsener Kolonien mit dem Faktor 10^3 bzw. 10^2. Unter der Voraussetzung, daß nur Plattenhälften mit 10 - 100 Kolonien für eine Bewertung herangezogen werden sollten, (vgl. 2.3, Verfahren B und C), liegt die untere Grenze auszählbarer Keime/ml bei 10^3 bzw. 10^4 pro ml, bei Verwendung unverdünnter Harnproben.

Bei einem Ösenvolumen von 1 µl weist eine Kolonienzahl von mehr als 100 pro Plattenhälfte mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine signifikante Bakteriurie (Keimzahl $> 10^5$ pro ml Harn) hin. Verwendet man diese Technik im Rahmen der bakteriologischen, routinemäßig durchgeführten Harndiagnostik, so läßt sich der klinisch interessante Keimzahlbereich bis um 10^5 Keime pro ml schon erfassen, wenn eine einzige Kulturplatte beimpft wird.

---

1) Zusammensetzung des Blutagar-Nährbodens:
1000 ml Aqua.dest., 25 g Pepton aus Fleisch, 5 g NaCl,
30 ml Menschenblut, 20 g Agar-Agar.

2) Hersteller: W. C. Heraeus GmbH, Hanau.

3. ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

3.1 Beurteilung der Grampräparate:

Von den insgesamt 230 untersuchten Urinproben waren in 88 nach GRAM gefärbten Präparaten Bakterien nachweisbar. Von diesen 88 Proben ließen sich in 21 Fällen bei quantitativen Keimzahl-Bestimmungen keine Bakterien nachweisen.

In Tabelle 1 werden diese Befunde mit den Ergebnissen der durchgeführten Keimzählungen (vgl. 3.2, Tabelle 2) verglichen.

Tabelle 1

Vergleich zwischen den Befunden im Grampräparat und den im "Flooding"-Verfahren ermittelten Keimzahlen

Anzahl der Urine	Vergleichs-Keimzahl/ml (Flooding)	Anzahl positiver Befunde im Grampräparat	Ergebnis der Grampräparate falsch positiv	falsch negativ
169	$0-10^4$	32	21	28
19	10^4-10^5	8	-	11
42	$> 10^5$	38	-	4
230		78	21	43

Die Bezeichnung "falsch-positiv" (10) wurde gewählt, da es sich bei den Befunden dieser 21 Harnproben ausschließlich um Keimzahlen zwischen 0 - 100 pro ml handelte, die somit als Sekundärverunreinigungen zu bewerten sind und für Diagnose und Therapie infektiöser Prozesse unberücksichtigt bleiben können.

Von den 100 ausgewählten bakterienhaltigen Urinproben zeigten 43 (im Vergleich mit den vier übrigen Methoden) einen negativen Befund. Diese "falsch-negativen" Resultate (d. h. negatives Grampräparat, aber Bakterienwachstum auf den angelegten Agarplatten bei quantiativen Keimzahlbestimmungen) beziehen sich jedoch vor allem auf Urine, die nach Auszählung mit Hilfe der vier quantitativ-kulturellen Methoden Keimzahlen unter 10^4 Keimen/ml aufwiesen. Nur viermal lag eine starke Diskrepanz vor, mit einer signifikanten Bakteriurie (Keimzahl über

10^5/ml, vgl. Tab. 1) bei der quantitativen Keimzahlbestimmung einerseits und einem negativen Befund im Grampräparat andererseits.

3.2 Folgende Tabelle 2 gibt die Ergebnisse der kulturellen Differenzierung und Gesamt-Keimzahlbestimmung von 230 untersuchten Harnproben wider. Auf diese Befunde beziehen sich die meisten Tabellen und Abbildungen, die in der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

Tabelle 2

Ergebnisse der kulturellen Differenzierung und Gesamtkeimzahl-bestimmung von 230 untersuchten Urinproben

Lfd. Nr.	Gesamtkeimzahl/ml (in log) für Verfahren A	B	C	D	Kulturelle Differenzierung
1	7,92	8.07	7,96	7.24	E. coli
2	7.15	6.42	5.43	5.38	E. coli/P. mirabilis
3	-	3.45	3.49	3.68	E. coli
4	-	2.10	3.40	-	E. coli
5	-	3.09	3.48	-	E. coli
6	7.88	7.56	7.38	7.94	E. coli
7	7.02	6.64	7.09	6.88	P. aeruginosa
8	-	3.64	3.85	-	E. coli
9	7.13	7.05	7.24	6.79	P. aeruginosa/P. mirabilis
10	-	4.33	4.43	4.15	P. vulgaris
11	-	4.49	4.83	4,28	P. aeruginosa
12	-	4.07	4.04	3.48	E. coli
13	-	2.79	3,04	2,90	Streptokokken (undifferenziert)
14	8.44	8,37	8.31	8.07	E. coli
15	-	4.44	4.56	4.57	Klebsiella
16	7.43	7.62	7.56	7.26	Enterobacter/P. mirabilis
17	-	3.73	4.11	4.08	Staphylokokken
18	-	3.78	3,72	-	Staphylokokken
19	-	4.58	4.58	4.28	E. coli
20	-	4.11	4.33	4.00	E. coli/S. zymogenes

Lfd.-Nr.	Gesamtkeimzahl/ml (in log) für Verfahren				Kulturelle Differenzierung
	A	B	C	D	
21	5.70	5.13	5.49	5.15	P. mirabilis
22	-	3.90	3.91	3.68	P. aeruginosa/Staphylokokken
23	-	3.48	3.51	3.23	E. coli
24	-	5.17	5.26	5.18	P. mirabilis/Streptokokken
25	-	4.25	4.19	4.18	E. coli
26	-	4.88	5.07	4.86	Staphylokokken
27	-	3.04	4.04	3.30	S. liquefaciens
28	7.27	6.86	6.83	7.11	E. coli
29	-	3.95	4.04	3.90	S. liquefaciens
30	-	3.39	3.28	3.23	E. coli
31	-	3.53	3.46	3.57	E. coli/S. zymogenes
32	-	4.02	4.04	3.00	P. mirabilis
33	7.23	7.20	7.28	7.11	E. coli/S. zymogenes
34	-	3.42	3,00	-	Streptokokken
35	-	4.07	4.09	4.09	P. mirabilis/Klebsiella/ E. coli/S. liquefaciens
36	6.78	6.73	6.80	6.60	E. coli/P. mirabilis
37	7.33	7.26	7.36	7.24	E. coli
38	-	3.27	3.18	3.18	S. zymogenes
39	5,00	5.24	5,20	5.42	E. coli
40	-	1.60	2.48	3.11	S. faecalis
41	7.26	7.24	7.40	7.21	E. coli
42	-	3.09	3.18	3.26	E. coli/Staphylokokken
43	-	5.24	5.26	5.23	P. mirabilis
44	-	6.32	6.28	6.30	P. mirabilis/Staphylokokken
45	-	5.58	5.57	5.73	∅
46	-	3.77	4,04	3,78	E. coli/Staphylokokken
47	-	5.30	5.48	5,03	E. coli
48	-	2.69	2.60	2.70	P. aeruginosa
49	-	4.47	4.53	4.60	S. faecalis
50	-	4.94	5.70	4.95	P. mirabilis

Lfd. Nr.	Gesamtkeimzahl/ml (in log) für Verfahren A	B	C	D	Kulturelle Differenzierung
51	-	2.87	3,20	3,30	P. mirabilis/S. zymogenes
52	6.70	6.92	7.01	6.66	E. coli/Enterobacter/ S. liquefaciens
53	7.38	7.25	7.40	7.36	E. coli/P. mirabilis/Streptokokken
54	-	3,78	3.85	3.60	Staphylokokken
55	-	4.32	4.42	4.38	Staphylokokken
56	6.85	6.98	6.79	7.12	E. coli
57	-	3.20	3.23	3.26	S. zymogenes
58	-	3.89	3,81	3.68	S. faecalis
59	-	3.27	3.18	3.15	E. coli/P. mirabilis
60	7.11	6.95	6.98	6.91	E. coli
61	7.38	7.45	6.42	7,01	P. mirabilis
62	-	3.09	3,30	-	E. coli/S. liquefaciens
63	-	3.90	3,72	3.53	E. coli
64	6.49	6.16	6.54	6.20	E. coli
65	-	2.78	3.68	2.60	E. coli
66	6.00	4.97	4.90	4.83	E. coli
67	-	4.73	4.76	4.70	E. coli
68	6.48	6.56	6.49	6.23	E. coli/Klebsiella/P. aeruginosa
69	-	2.97	2.70	3.08	E. coli
70	-	4.78	5.11	4.54	P. mirabilis
71	-	4.15	4.26	4.08	Staphylokokken
72	-	5.95	6.02	5.94	E. coli
73	6.30	4.79	4,78	4.70	Staphylokokken
74	7,00	7.29	7.31	6.81	E. coli
75	-	4.31	4.40	3.90	S. faecalis
76	-	5.15	5.59	5.32	P. aeruginosa
77	6.48	5.22	5.26	4.96	E. coli/Enterobacter
78	-	2.96	3,30	2.96	E. coli/S. liquefaciens
79	-	2.76	3.08	3.11	Streptokokken
80	-	3.95	4.11	3.85	P. mirabilis

Lfd. Nr.	Gesamtkeimzahl/ml (in log) für Verfahren A	B	C	D	Kulturelle Differenzierung
81	-	4.35	3.78	3.70	E. coli/Enterobacter
82	-	4.89	5.54	4.48	P. mirabilis
83	-	4.75	4.72	4.11	S. faecalis/P. mirabilis
84	-	5.75	5.76	5.49	P. mirabilis
85	-	2.76	3.00	-	E. coli
86	-	4.30	5.00	5.00	P. aeruginosa
87	-	5.30	5.12	4.53	E. coli
88	8.25	8.22	8.46	7.97	ϕ
89	6.40	7.25	7.59	7.32	E. coli
90	-	2.45	3.20	2.85	E. coli
91	7.45	7.11	7.66	7.04	P. mirabilis/Enterobacter
92	-	7.56	7.96	7.53	E. coli/Enterobacter
93	-	2.97	3.00	3.00	S. faecalis
94	-	5.30	5.00	5.59	E. coli
95	-	3.28	3.00	3.30	Streptokokken/Staphylokokken
96	-	4.30	5.00	4.35	Staphylokokken/E. coli
97	-	3.34	3.30	3.80	Staphylokokken
98	8.14	8.26	8.68	8.21	E. coli/P. aeruginosa
99	-	3.92	3.90	3.00	E. coli
100	-	3.42	3.50	3.08	P. mirabilis

Legende: (zu Tabelle 2)

A: Keimzählung in der HELBER-Kammer
B: Keimzählung im Flooding-Verfahren
C: Keimzählung mittels Marburg-Pipette
D: Keimzählung mittels Platinösen

-: wegen zu geringer Keimzahl/ml in diesem Verfahren nicht zählbar.

Urinproben mit negativem bakteriologischen Befund sind in der Tabelle nicht aufgeführt.

3.21 Ergebnisse der verschiedenen Kulturverfahren:

Die qualitativ-kulturelle Differenzierung der 100 positiven Harnproben ergab, wie aus Tabelle 2 und 4 ersichtlich, folgende Aufgliederung:

68 Urine zeigten Monokulturen ; aus 30 Urinproben ließen sich Mischkulturen züchten. 2 Urinproben, deren Befunde mittels quantitativ-kultureller Keimzählung positiv ausfielen, hatten ein negatives kulturelles Ergebnis.

Der Anteil der verschiedenen Erregerarten, sowie ihr Anwachsen nur nach Anreicherung, geht aus den Tabellen 3 und 4 hervor.

Tabelle 3

Häufigkeitsverteilung der Keimarten in 100 kulturell positiven Urinproben

Keimart	Anzahl der Isolate
E. coli	52
Proteus	23
Enterokokken	18
P. aeruginosa	9
Enterobacter	6
Klebsiella	4
sonstige Keime	20
insgesamt	132

Im Gegensatz zu einigen Autoren (29/49/65/39), die Urinkeime auf sogenannten Spezialnährböden anzüchten, verwenden wir ausschließlich Blutagar (Zusammensetzung vgl. 2,3, Verfahren B). Auch zur weiteren Differenzierung der Keime haben sich diese Nährböden vorzüglich bewährt.

Tabelle 4

Beziehung zwischen Keimzahl und kulturellem Erregernachweis

Anzahl der Urine	Vergleichs-Keimzahl/ml Urin (Flooding)	Anwachsen der Keime in: Monokulturen	Mischkulturen	Anzahl der Isolate [1]: Wachstum nach 24 h Bebrütung	Wachstum nur nach Anreicherung
39	$< 10^4$	30	9	21	27
19	10^4-10^5	14	5	24	1
42	$> 10^5$	24	16	50	9
100		68	30	95	37

Nach Tabelle 4 wachsen Erreger bei Keimzahlen unter 10^4 pro ml Urin sehr viel häufiger erst nach Anreicherung an als Keime, die aus Urinproben mit wesentlich höheren Keimzahlen stammen. Darüberhinaus besteht durchaus die Möglichkeit, daß in Keimzahlbereichen von über 10^5 Keimen/ml Urin auch hier Bakterien erst nach Anreicherung nachgewiesen und somit qualitativ erfaßt werden können; in der vorliegenden Arbeit traf dies in 9 Fällen zu.

3.22 Beurteilung der quantitativen Keimzahl-Bestimmungen:

3.221 Keimzahlen in Relation zum Geschlecht der Patienten.

Eine Aufschlüsselung der Keimzahlhöhen in Relation zur Geschlechtsverteilung gibt die folgende Tabelle 5 wieder.

Tabelle 5

Keimzahlhöhe in Abhängigkeit von der Geschlechtsverteilung der Patienten

Keimzahl pro ml Urin	$< 10^4$	10^4-10^5	10^5-10^6	$> 10^6$	Anzahl der Patienten
♀	6	4	6	12	28
♂	33	15	10	14	72
Gesamtzahl der positiven Urinproben	39	19	16	26	100

1) Die Zahlenangaben der beiden letzten Spalten beziehen sich nicht auf die Anzahl der Urinproben, sondern auf die Zahl der Isolate insgesamt, wie sie in Tabelle 3 aufgegliedert sind.

3.222 Keimzahlen und Art der Uringewinnung.

Tabelle 6 vergleicht die Keimzahl mit der Art der Uringewinnung (Katheter- oder Mittelstrahlurine).

Tabelle 6

Keimzahlhöhe in Abhängigkeit von der Uringewinnung

Keimzahl pro ml Urin	$<10^4$	10^4-10^5	$>10^5$	Anzahl der Urinproben
Katheterurin	6	4	20	30
Mittelstrahlurin	33	15	22	70

3.223 Ergebnisse der Keimzählungen.

Vergleicht man die Mittelwerte der Keimzahlen (Tab. 2), die im Flooding-Verfahren (B), mittels Marburg-Pipette (C) und mittels kalibrierten Platinösen (D) ausgezählt wurden, untereinander, so verhalten sich die Ergebnisse dieser Methoden wie 1 : 1,02 : 0,94.

Aus Tabelle 2 geht ferner hervor, daß das Zählen von Urinkeimen in der HELBER-Kammer nur für höhere Keimzahlen (über 10^6/ml) möglich ist. Infolgedessen erscheint eine quantitativ-mikroskopische Keimzählung in der HELBER-Kammer als routinemäßig durchgeführte Methode in der bakteriologischen Urindiagnostik weniger geeignet. Deshalb wurde die HELBER-Kammer in der vorliegenden Arbeit vor allem als Vorzählmethode (15) benutzt (siehe auch unter 2.3, Verfahren A).

Die übrigen drei Keimzahl-Bestimmungsmethoden lassen sich mit Hilfe einer graphischen Darstellung näher analysieren (16). Bei der Auftragung der Keimzahl pro ml Urin des einen Verfahrens (Ordinate) inbezug zur Koloniezahl pro Platte des anderen Verfahrens (Abszisse) ergibt sich eine annähernd lineare Regression (siehe graphische Abbildungen 1, 2 und 3).

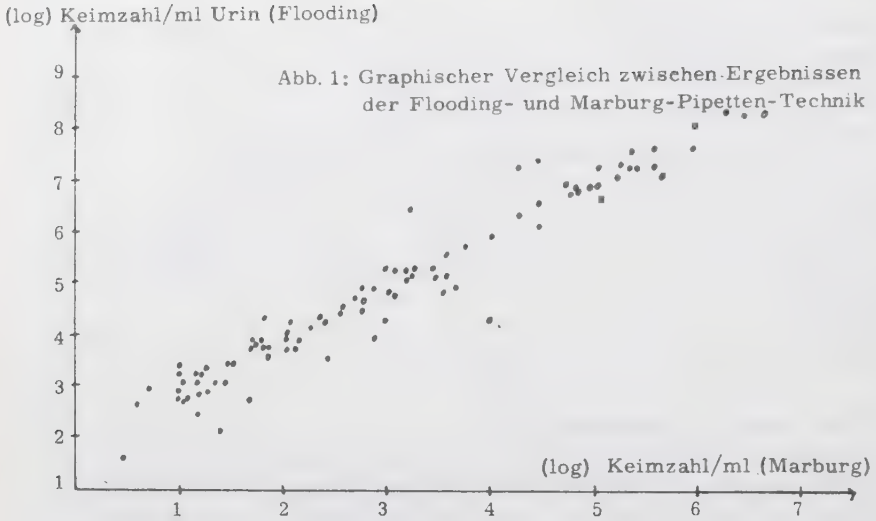

Abb. 1: Graphischer Vergleich zwischen Ergebnissen der Flooding- und Marburg-Pipetten-Technik

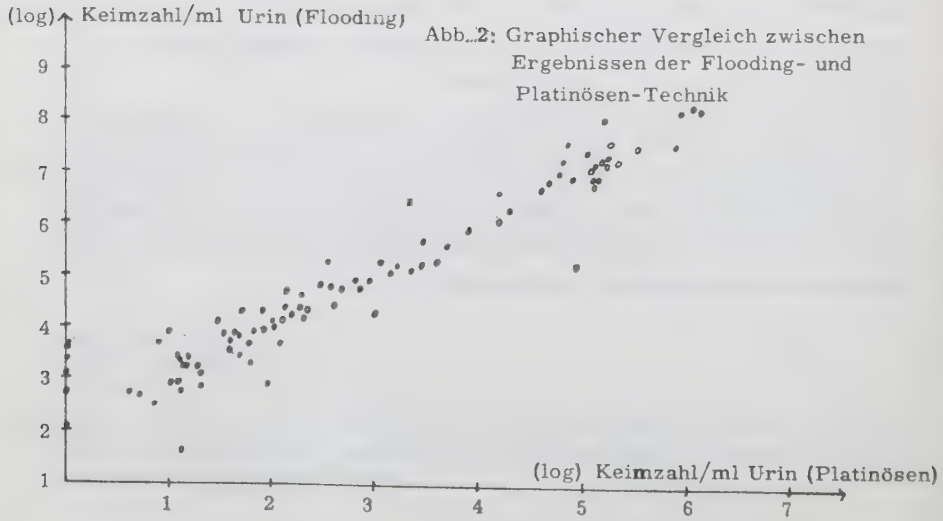

Abb. 2: Graphischer Vergleich zwischen Ergebnissen der Flooding- und Platinösen-Technik

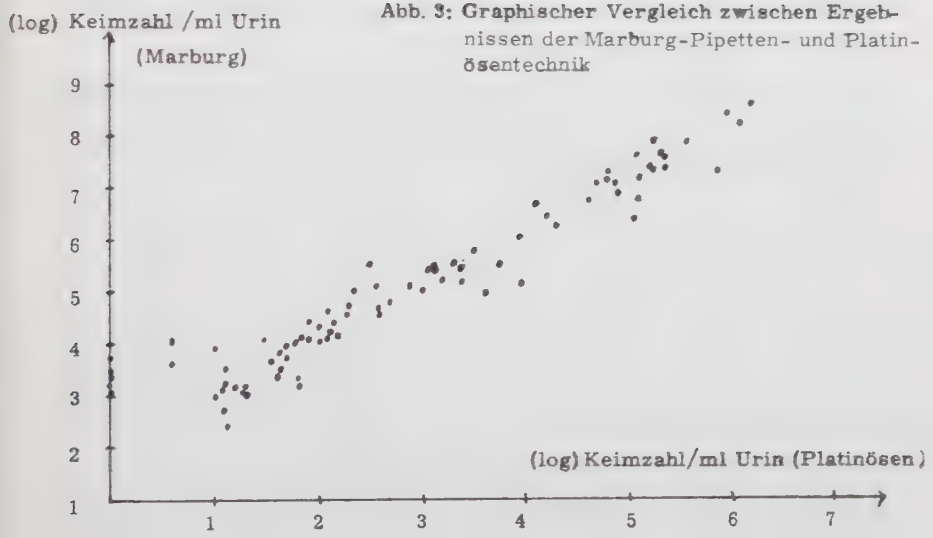

Abb. 3: Graphischer Vergleich zwischen Ergebnissen der Marburg-Pipetten- und Platinösentechnik

3.3 Unterschiede in der Reproduzierbarkeit und der Keimzahlausbeute bei 3 Ausstreich-Verfahren (Methoden B, C und D):

Durch Keimzählungen in einer Bakterien-Suspension (unabhängig von Urinproben) ließ sich prüfen, inwieweit die nach den Methoden B, C und D ermittelten Keimzahlen reproduzierbar sind, und ob sich Unterschiede in der Ausbeute anzeigen. Zu diesem Zweck wurden je 50 mal Keimzahlbestimmungen ein und derselben Suspension durchgeführt.

Als Maß für die Reproduzierbarkeit der einzelnen Zählverfahren dient die Standardabweichung (s_x) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$). Zur Ermittlung von eventuell vorhandenen Unterschieden bezüglich der Ausbeute wurden die Mittelwerte im t-Test verglichen.

In der folgenden Tabelle (Tab. 8) sind zunächst die logarithmischen Meßwerte angegeben; die statistischen Parameter, die sich hieraus errechnen lassen, sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 8

Mit drei verschiedenen Methoden (B, C und D) ermittelte Keimzahlen einer E. coli-Suspension bei 50 wiederholten Bestimmungen

Nr.	Keimzahl/ml (in log) für Verfahren			Nr.	Keimzahl/ml (in log) für Verfahren		
	B	C	D		B	C	D
1	8,30	8,63	8.04	26	8.45	8.64	8.04
2	8.73	8,60	8.23	27	8.66	8.66	8.36
3	8.66	8.67	8.45	28	8.53	8.75	7.70
4	8.60	8.62	8.23	29	8.53	8.64	8.30
5	8.66	8.68	7.60	30	8.48	8.71	8.00
6	8.66	8.72	7.95	31	8.45	8.62	7.78
7	8.87	8.70	7.70	32	8.70	8.71	8,00
8	8.60	8.74	8.43	33	8.60	8.69	8,57
9	8,75	7.63	7.78	34	8.75	8.76	7.60
10	8.62	8.76	7.90	35	8.75	8.60	7.78
11	9.02	8,79	8.57	36	9.53	8.77	8.54
12	8.18	8.60	8.43	37	8.68	8.85	7.85
13	8.62	8.64	8.26	38	8.64	8.59	8.45
14	8.88	8.76	7.70	39	8.53	8.58	8.53
15	8.64	8.72	8.59	40	8.72	8.56	8.53
16	8.70	8.58	8.08	41	8.64	8.68	8.04
17	8.56	8.67	7.95	42	8.70	8.57	7.85
18	8.53	8.62	8.11	43	8.70	8.62	7.95
19	8,60	8.63	8.46	44	8.75	8.56	7.95
20	8.68	8.67	7.85	45	8.70	8.69	8.63
21	8.53	8.72	7.70	46	8.66	8.73	8.49
22	8.75	8.75	8.32	47	8.70	8.66	8.36
23	8.76	8.67	8.15	48	8.30	8.79	8.61
24	8.66	8.72	8.11	49	8.48	8.45	8.15
25	8.70	8.65	8.38	50	8.42	8.67	8.36

Tabelle 9

Beurteilung von Reproduzierbarkeit und Keimzahl-Ausbeute der untersuchten Verfahren B, C und D

Keimzähltechnik	$\bar{x}$	s_x	$s_{\bar{x}}$	t	
Flooding (B)	8, 63	0, 15	0, 0208		
				1, 96 (p > 0, 05)	
Marburg-Pipette (C)	8, 67	0, 07	0, 0104		10, 20 (p < 0, 05)
				12, 00 (p < 0, 05)	
Platinösen (D)	8, 15	0, 31	0, 0435		

Legende

$\bar{x}$: Mittelwert

s_x: Standardabweichung, $s_{\bar{x}}$: Standardabweichung des Mittelwertes

t: Testgröße zur Prüfung der Fragestellung

p: Irrtumswahrscheinlichkeit

Aus Tabelle 9 geht hervor, daß sich die Mittelwerte der logarithmierten Keimzahlen der Verfahren B, C und D wie 8, 63 : 8, 67 : 8, 15 verhalten. Die Reihenfolge der Keim-Ausbeute dieses Versuches stimmt demnach mit Keimzählungen in Harnproben überein.

Die höchste Keimausbeute erhält man durch Zählen mit der Marburg-Pipette, gefolgt von Flooding- und Platinösen-Technik. Sämtliche Werte für die Streuung der Einzelbeobachtungen sowie der Mittelwerte liegen innerhalb einer Zehnerpotenz. Infolgedessen darf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse - unter Berücksichtigung klinischer Belange - bei den geprüften Techniken als gut angesehen werden.

Im t-Test sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0, 05 nur die Mittelwerte von Flooding und Marburg-Pipette nicht signifikant unterschiedlich. Jedoch ist der signifikante Unterschied der Mittelwerte der übrigen Keimzahl-Kollektive klinisch bedeutungslos, da Einzelwerte und Mittelwerte um weniger als eine Zehnerpotenz streuen.

Unter Berücksichtigung von Reproduzierbarkeit und Ausbeute sind demnach die genannten Verfahren geeignet, Keimzahlen - zunächst in künstlichen Keimsuspensionen - quantitativ zu bestimmen.

Da die Reihenfolge der Keimausbeute in solchen künstlich hergestellten Aufschwemmungen mit den Zählergebnissen in Harnproben gut übereinstimmt, darf man annehmen, daß die Aussagen bezüglich Reproduzierbarkeit und Ausbeute der Verfahren auf Keimzahlbestimmungen von Harnproben übertragbar sind und hier in gleicher Weise zutreffen.

4. DISKUSSION

4.1 Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Vergleich verschiedener Techniken der Keimzahlbestimmung in Harnproben. Hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Klinik sei hier auf die zahlreichen einschlägigen Publikationen verwiesen (1/2/4/9/10/11/14/27/28/40/42/45/61). Bakteriologische Methoden zur Bestimmung von Keimzahlen in Harnproben sollten folgende Bedingungen erfüllen:

a) Reproduzierbarkeit in allen Keimzahlbereichen.
b) Das Ergebnis solcher Keimzahlbestimmungen soll nahe an der "wirklichen" Gesamt-Keimzahl liegen.
c) Der technische und zeitliche Aufwand der Methoden soll praktischen Laboratoriumsbedingungen angemessen sein.

Die Reproduzierbarkeit ist bei den geprüften Verfahren - Flooding, Zählung mittels Marburg-Pipette und kalibrierten Platinösen - als sehr gut zu beurteilen. Die Standardabweichungen vom Mittelwert ($s_{\bar{x}}$) liegen jeweils zwischen 0,01 und 0,04 (siehe auch Tabelle 9). Für "Flooding" spricht die Treffsicherheit des Verfahrens, die in der Literatur allgemein mit 95 - 98 % angegeben wird und damit den Gußplattentests (37) vergleichbar ist. "Falsch-negative" Ergebnisse, d. h. Urinproben, die unter Verwendung von anderen Methoden positive Ergebnisse zeigten, die im Flooding-Verfahren jedoch negativ ausfielen, wurden praktisch nicht festgestellt.

Der in der Anleitung zur Marburg-Pipette angegebene Wert für die Standardabweichung s_x ($\leq 0,06$)-beim Pipettieren von reinem Wasser-stimmt sehr gut mit dem Ergebnis überein, das in den vorliegenden Untersuchungen erzielt wurde (vgl. Tabelle 9).

Vorversuche zeigten, daß ständiges Ausglühen der geeichten Platinösen keinen nennenswerten Einfluß auf das Volumen der aufgenommenen Flüssigkeitsmenge hat. Die Abweichungen der Werte hielten sich bei einem Vergleich zwischen neuen und "alten" Ösen, d. h. Ösen, die im Verlauf der Versuche bereits etwa 1000 mal verwendet worden waren, in Grenzen. (s_x für neue Ösen betrug (bei N = 20) 0,08, s_x für "alte" Ösen war 0,2).

Ein weiterer Vorteil der "Ösenmethode" nach RINGELMANN u. Mitarb. (49) liegt darin, daß sich die Koloniezahl pro Platte aus zwei volumenmäßig verschiedenen Einheiten zusammensetzt, da die eine Plattenhälfte mit 1 µl, die andere mit 10 µl beimpft wird. Die errechnete, mittlere Keimzahl stützt sich also auf zwei voneinander unabhängige Zahlenwerte. Wird diese Ösentechnik nach RINGELMANN u. Mitarb. (49) routinemäßig verwendet, so läßt sich der klinisch interessante Keimzahlbereich um 10^5 Keime pro ml bereits auf einer einzigen Agarplatte aus Nativurin erfassen (vgl. 2.3, Verfahren D).

Bei einem Ösenvolumen von 1 µl deutet das Anwachsen von mehr als 100 Kolonien pro Plattenhälfte mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine signifikante Bakteriurie hin.

So gesehen, dürfte diese Methode - die ein höheres Maß an Genauigkeit bietet als einfache Screeningtests (6/14/27/41), zum anderen, sich ohne zusätzlichen Zeitaufwand in die parallel laufende kulturell-bakteriologische Harnanalyse einfügt - als Routineverfahren in der mikrobiologischen Urindiagnostik gut geeignet sein.

Die Ergebnisse der Untersuchungen erbrachten ferner, daß eine quantitative Keimbestimmung mittels Flooding-Verfahren und Marburg-Pipette für Sekundärverunreinigungen- vor allem in niedrigeren Keimzahl-Bereichen - etwas anfälliger ist, als dies z. B. für kalibrierte Platinösen zutrifft. Pipettierfehler sind auch bei sehr sorgfältigem Arbeiten nicht auszuschließen. Dies erklärt die Tat-

sache, daß bei einem negativen Resultat mittels Ösentechnik nicht selten auf den Agarplatten aus Verdünnungsreihen des Flooding-Verfahrens und der Marburg-Pipette Keime angewachsen waren. Die meist relativ kleine Zahl der angewachsenen Kolonien sowie die zahlenmäßige Verteilung auf den Agarplatten der verschiedenen Verdünnungsstufen lassen jedoch die Schlußfolgerung zu, daß es sich hier um sekundäre Verunreinigungen während des Arbeitsvorganges handeln dürfte. Da sich solche Differenzen fast ausschließlich in Keimzahl-Bereichen unter 10^3 abspielen, haben sie auf die Gesamtbeurteilung der Methoden bezüglich ihrer Genauigkeit und biologischen Erfassungsbreite keinen entscheidenden Einfluß.

Auswertungsfehler können auch dann entstehen, wenn die geringe Flüssigkeitsmenge (0,5 ml im Flooding-Verfahren und 10 µl bei der Marburg-Pipette) auf der Oberfläche der Blutagarplatten nicht gleichmäßig verteilt wird. Dies läßt sich z. B. nur schwerlich vermeiden, wenn die Viskosität der Harnproben sehr hoch ist oder ein Verlaufen der Suspension durch kleine Partikel erschwert wird. Da die Urinsuspensionen durch die kalibrierten Platinösen in einem Arbeitsgang auf der Nährbodenoberfläche aufgetragen und ausgestrichen werden, ist eine ungleichmäßige Verteilung nicht zu erwarten.

Gegenüber der von LODENKÄMPER (39) beschriebenen Methode - Bakterienkolonien in einem Hochschicht-Agarröhrchen zu zählen - dürften diese quantitativ-kulturellen Ausstreich-Verfahren überlegen sein. Allerdings fehlen für Keimzählungen im Hochschicht-Agarröhrchen (39) noch vergleichende Untersuchungen mit anderen quantitativen Methoden sowie statistische Angaben über Genauigkeit und Reproduzierbarkeit dieser Technik; auch ist die Nährbodenzubereitung und das Abfüllen in die einzelnen Röhrchen mit ziemlichem Aufwand verbunden und für eine routinemäßig durchzuführende Untersuchungstechnik relativ umständlich.

LODENKÄMPERs Verfahren (39) hat jedoch den großen Vorteil, daß auch strikte Anaerobier erfaßt werden können, was mit den hier geprüften Untersuchungs-Verfahren nicht möglich ist. Inwieweit bei bakteriologischer Routineuntersuchung von Harnproben obligaten Anaerobiern als Infektionserregern eine wesentliche Bedeutung zukommt (39), kann vorerst nicht sicher gesagt werden.

4.2 Um die Resultate der drei Verfahren (B, C und D) auszuwerten, wurden die untersuchten Harnproben in fünf Gruppen eingeteilt. Diese orientieren sich an der im Flooding-Verfahren ermittelten Keimzahl.

Die Fehlbestimmungen, die sich bei einem solchen Vergleich zwischen Flooding-Verfahren einerseits und der Zählung mittels Marburg-Pipette bzw. kalibrierten Platinösen andrerseits ergaben, sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10

Abweichende Ergebnisse in einzelnen Keimzahlbereichen

Gruppe	Anzahl der Urine	Keimzahl/ml Urin (Flooding) B	Ergebnisse im Verfahren C		D	
			falsch-positiv	falsch-negativ	falsch-positiv	falsch-negativ
I	139	$0 - 10^2$	4	24	4	21
II		$10^2 - 10^3$	4	23	1	17
III	30	$10^3 - 10^4$	-	2	-	6
IV	19	$10^4 - 10^5$	-	-	-	-
V	42	$>10^5$	-	-	-	-

Falsch-positiven Ergebnissen der Gruppe I und II kommt insofern keine Bedeutung zu, da bei Keimzahlen von weniger als 10^3 pro ml Mittelstrahl- und Katheterurin sich klinische Konsequenzen im allgemeinen nicht ergeben.

Bei Harnproben mit falsch-negativen Resultaten handelt es sich meist um Urine, die nach kultureller Anzüchtung eine typische Kontaminationsflora aus z. B. apathogenen Staphylokokken, Corynebakterien oder Laktobazillen zeigten.

Im übrigen können diese mittels Marburg-Pipette und kalibrierten Platinösen erhobenen "falsch-negativen" Befunde eher als "falsch-positive" Ergebnisse des Flooding-Verfahrens gedeutet werden, da diese Technik mögliche Verunreinigungen durch Sekundärkeime empfindlicher anzeigt.

Wichtiger sind dagegen die "falsch-negativen" Bestimmungen der Gruppe III im Keimzahlbereich von 10^3-10^4 Bakterien pro ml Harn. Hier wären jene 6 Urinproben näher zu erörtern, die bei Keimzählungen mittels kalibrierten Platinösen negative Resultate zeigten.

4.3 Für routinemäßig durchgeführte Untersuchungen müssen bei Verwendung des Flooding-Verfahrens mindestens vier, bei Zählung mittels Marburg-Pipette zwei Agar-Platten, bei einer Keimbestimmung mit kalibrierten Platinösen (49) dagegen nur eine Agar-Platte angelegt werden. Auf diese Weise lassen sich mit Hilfe der genannten Methoden die klinisch interessanten Keimzahlbereiche bis um 10^5 Keime pro ml Urin erfassen.

RINGELMANN und Mitarb. (49) konnten bei Vergleichsuntersuchungen zwischen den mit der Öse bestimmten Keimzahlen und den im Gußplattentest ermittelten Werten gute Ergebnisse verzeichnen. Hierbei habe sich eine fast 100 %ige Übereinstimmung in Keimzahlbereichen unter 10^4 und über 10^5 Keimen pro ml ergeben, während bei Werten zwischen 10^4 und 10^5 Keimen pro ml Urin im Gußplattentest in mehr als 50 % der Fälle das 10- oder mehrfache der Ösenzählung beobachtet wurde. Demgegenüber zeigten die Resultate der vorliegenden Arbeit, daß eine Keimzahlbestimmung mittels Platinösen (49) nicht nur für Werte zwischen 10^4 und 10^5 Keimen pro ml Urin, sondern generell in allen Keimzahlenbereichen zu niedrigeren Ergebnissen (bis zu einer Zehnerpotenz) führt als Keimzahlbestimmungen mittels "Flooding" und "Marburg"-Pipette. Diese niedriger liegenden Keimzahlen hatten allerdings niemals eine echte Verfälschung der Werte zur Folge.

Harnproben mit einem Bakteriengehalt von mehr als 10^5 Keimen/ml lassen sich dadurch erkennen, daß die angewachsenen Kolonien miteinander konfluieren, mitunter dichte Rasen bilden und die Agaroberfläche mehr oder weniger verdecken.

Um die quantitative Auswertung der angelegten Bakterien-Kulturen rationeller zu gestalten, vergleichen TOBLER und ZOLLER (50) - bei Untersuchungen- mit dem dip-slide-Test "URICULT" ® - die angewachsenen Kolonien mit photographischen Abbildungen, die von bekannten Keimzahlen/ml Urin hergestellt wurden. Bei "URICULT"® handelt es sich um einen Objektträger, der in einem sterilen, verschlossenen Plastikbehälter steckt. Die eine Seite ist mit Nähragar, die andere Seite mit MacConkey-Agar beschichtet. Gegenüber der in der vorliegenden Arbeit geprüften kulturellen Keimzüchtung mittels kalibrierten Platinösen, erscheint das Uricult-Verfahren insofern flexibler zu sein, da die aufge-

tragenen Urinkeime der "überall anlegbaren Kultur je nach Temperaturbedingungen bereits auf dem Versandwege anwachsen können" (66). Die Handhabung besteht lediglich darin, nach Öffnen des Röhrchens den Objektträger in frisch gelassenen Urin einzutauchen und nach Abtropfenlassen des überschüssigen Anteils wieder in den sterilen Behälter zurückzuschieben, zu verschließen und bei 37°C mehrere Stunden zu bebrüten.

4.4 Die Genauigkeit, mit der sich im Grampräparat aufgrund der mikroskopierten Keimzahl eine Bakteriurie erfassen läßt, wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt (1/10/14/26/37/38/53), sie liegt durchschnittlich zwischen 85 und 99 %. Manche Autoren (1/10/37/53) plädieren dafür, daß das Auffinden zahlreicher Stäbchenbakterien im Sediment eine signifikante Bakteriurie beweise bzw. Bakterien nur bei mehr als 10^5 Keimen pro ml Urin im mikroskopischen Präparat zu sehen sind. LINZENMEIER (37) weist in diesem Zusammenhang jedoch zugleich auch auf die große Zahl der "falsch-positiven" Befunde (über 25 %) hin. Gegenüber quantitativen Urinkulturen bietet das Grampräparat die Möglichkeit, auch bakteriostatisch beeinflußte Erreger zu erfassen (10). Da sich jedoch das Auszählen von Keimen im Grampräparat kaum standardisieren läßt, kommt es für die Keimzahlbestimmung in Urinproben nicht in Betracht.

4.5 Durch die mikroskopische Keimzahl-Bestimmung in der HELBER-Kammer (47) läßt sich eine kulturelle Anzüchtung der Keime umgehen; spezielle bakteriologische Laboratoriumseinrichtungen wie Brutschrank, Nährbodenküche etc. werden hierfür nicht vorausgesetzt. So gesehen stellt die HELBER-Kammer, als Variante der zahlreichen Zählkammern, wie sie in der Laboratoriumsdiagnostik allgemein üblich sind, ein elegantes Verfahren dar, das, z. B. in jeder Klinik und Allgemeinpraxis angewendet werden könnte. Der minimale Arbeitsaufwand - das Ergebnis läßt sich im Unterschied zu allen übrigen kulturell-quantitativen Keimzählungen noch im gleichen Arbeitsgang ermitteln - sowie die von vielen Autoren angegebene sehr geringe Fehlerbreite in der Aussagekraft des Verfahrens (15/47) wirken zunächst imponierend. Diese Genauigkeit bezieht sich jedoch nur auf gramnegative Stäbchenbakterien. Kokken lassen sich dagegen nur sehr schwer bzw. überhaupt nicht zählen, da sie von

den im Harn vorkommenden und während der Aufbewahrung im Kühlschrank noch vermehrt sich bildenden Kristallen kaum zu unterscheiden sind. Dies dürfte die Hauptursache der "falsch-positiven" Ergebnisse (bis zu 25 % und mehr (43/47) sein.

Allerdings bleibt einzuwenden, daß der überwiegende Anteil der Harnwegsinfektionen durch gramnegative Stäbchenbakterien verursacht wird, während der Anteil der Kokken einen geringen Prozentsatz ausmacht (43).

Der große Nachteil der in der vorliegenden Arbeit verwendeten HELBER-Kammer liegt jedoch darin, daß sich nur Urinproben quantitativ auswerten lassen, die einen sehr hohen Keimgehalt, nämlich 10^6 pro ml Harn aufweisen. Erregerzahlen unter 10^6 pro ml sind in der HELBER-Kammer nicht sicher festzustellen und ergeben in Vergleich mit anderen Verfahren meist falsch-negative Resultate.

4.6 Im Gegensatz zur HELBER-Kammer lassen sich mit den drei, in den vorliegenden Untersuchungen benutzten, quantitativ-kulturellen Methoden die angewachsenen Kolonien erst nach 20 - 24 h Bebrütung zählen.

Dabei sind Arbeits- und Materialaufwand im "Flooding"-Verfahren wesentlich größer als bei Keimzahlbestimmungen mittels "Marburg"-Pipette und kalibrierten Platinösen. Neben Blutagar-Platten sind Reagenzröhrchen zum Anlegen von Verdünnungsreihen sowie sterile 10- und 1-ml-Pipetten notwendig. Auf Fehlermöglichkeiten, die sich hieraus ergeben können, wurde bereits hingewiesen.

Die Vorteile der "Marburg"-Pipette sind vor allem methodischer Natur. Mit wenigen Handgriffen läßt sich der 10 µl fassende Pipetteninhalt auf die Oberfläche der Agarplatte bringen, sowohl das übliche Pipettieren von Flüssigkeitsvolumina als auch ein Sterilisieren von Pipetten fallen weg. Von Zeit zu Zeit ist es jedoch ratsam, den Pipettier-Automaten mit Methanol zu reinigen. Die Methode dürfte etwas teuerer sein, da die zu je 50 Stück verpackten, sterilen Pipettenspitzen aus Kunststoff nach einmaligem Gebrauch am besten verworfen werden. Bei einem Vergleich zwischen frischen Pipettenspitzen mit solchen, die bereits ein- bis mehrmal benutzt und autoklaviert worden waren, zeigten sich beträchtliche Unterschiede in der Koloniezahl der angewachsenen Urinkeime.

Das Verfahren mit kalibrierten Platinösen ist in seiner Handhabung zeitsparend, technisch einfach und nicht aufwendig. Als einziges Instrumentarium sind für die Durchführung zwei auf 10 µl bzw. 1 µl geeichte Platinösen erforderlich, die als solche auch in anderer Weise verwendet werden können, z.B. zum gleichzeitigen Ausstreichen auf Spezialnährböden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der bakteriologischen Diagnostik gewinnen Keimzahlbestimmungen bei Harnwegsinfektionen zunehmend an Bedeutung. Grundsätzlich stehen dafür mehrere, auf verschiedenen Prinzipien beruhende Methoden zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit werden vier Techniken - Keimzählung in der HELBER-Kammer, im Oberflächen-Kultur-Verfahren mittels "Flooding" sowie durch Ausstreichen mit "Marburg"-Pipette und kalibrierten Platinösen - auf ihre Eignung untersucht, unter praktischen Bedingungen eines bakteriologischen Laboratoriums zur Anwendung zu kommen. Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren werden diskutiert. Die den Befunden zugrundeliegenden Resultate wurden anhand von Keimzahl-Bestimmungen aus Mittelstrahl- und Katheterharnproben erhalten. Wesentliche Ergebnisse erbrachten ferner künstlich hergestellte Keimaufschwemmungen einer E. coli-Suspension.

1. Die Anwendung der HELBER-Zählkammer ist infolge ihres Kammervolumens auf Keimzahlen von über 10^6 Keimen pro ml beschränkt. Darunter liegende Keimzahlwerte können nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

2. Die Befunde anhand der drei anderen genannten Verfahren sind gut miteinander vergleichbar und reproduzierbar.

3. Das "klassische" Flooding-Verfahren, Bakterien in der Oberflächenkultur aus Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Proben quantitativ zu bestimmen, ist technisch, zeitlich und vom Materialverbrauch her relativ aufwendig, und dürfte deshalb für die Routine-Anwendung in Laboratorien mit größerer Anzahl von Untersuchungsproben ausscheiden.

4. Von "Marburg"-Pipette und kalibrierten Platin-Impfösen sind letztere für Keimzählungen unter praktischen Bedingungen vorzuziehen, da sich die Benutzung der Ösen auch in die mit der Keimzahlbestimmung parallel laufende kulturell-bakteriologische Diagnostik einfügt. Der Verschleiß dieser Ösen ist minimal.

Herrn Prof. Dr. W. Döll möchte ich für die Überlassung des Themas und für seine wertvollen Hinweise und Anregungen meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. H.P.R. Seeliger danke ich für die in seinem Institut gebotene Arbeitsmöglichkeit und für die freundliche Übernahme des Korreferates.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALKEN, C.E.: Die unspezifische Entzündung in der Urologie. Urol. 1, 2 - 4 (1962)

2. ASSHER, A.W., SUSSMAN, M., WATERS, W.E., DAVIS, R.H.: Urine as a medium for bacterial growth. Lancett II, 1037 - 1041 (1966)

3. BENNER, E.J.: Simple disposable method für quantitative culture of urine. Appl. Microbiol. 19, 409 - 412 (1970)

4. BIRNBAUM, M., LAMM, D.: Asymptomatische Bakteriurie und Pyelonephritis. Vortrag, gehalten auf der 1. Tagung der Gesellschaft für Nephrologie der DDR, Berlin 1967

5. BOEHM, J.J., HAYNES, J.L.: Bacteriology of "midstream catch" urines. Amer. J. Dis. Child. 111, 366 (1966)

6. BÖHNE, G.: Früherkennung von Harnwegsinfektionen durch Nitritnachweis mit Harn-Teststreifen. Med. Klin. 64, 887 - 890 (1969)

7. BRAUN, O.H., DEHNERT, J., HAENEL, H., HOFFMANN, M., KIENITZ, M., MEYER, J.B., REPLOH, H., REUTE, G., SEELIGER, H.P.R., WERNER, H.: Methoden der bakteriologischen Stuhluntersuchungen. Zbl. Bakt. Orig. 200, 405 - 416 (1966)

8. BRÜHL, P., STEINMETZ, U.: Zur Frage der quantitativ-kulturellen Keimdiagnostik im Urin bei unspezifischen Harnwegsentzündungen. Med. Klin. 59, 299 (1964)

9. BRÜHL, P.: Serologie und Pyelonephritis. Praxis 28, 965 - 967 (1967)

10. BRÜHL, P., MÜLLER-MARIENBURG, H.W., SÖKELAND, J.: Beurteilung von Harnbefunden in der urologischen Diagnostik. Mün ch. Med. Wschr. 109, 1448 - 1454 (1967)

11. BROD, J.: Chronische Pyelonephritis. D. Med. Prisma 3, 3 - 36 (1970)

12. COLE, P.G., CHARD, T.: Diagnosis of significant bacteriuria in pregnance. Lancet II, 326 - 327 (1963)

13. DELUGA, F.D., FISCHER, J.H., SWENSON, O.: Verlauf rezidivierender Harnwegsinfektionen bei Jugendlichen und Kindern. New Engl. J. Med. 268, 75 (1963)

14. DEPTALLA, G., MINTER, W., NAUMANN, G.: Vergleichende Untersuchungen über Schnellverfahren zur Erfassung einer signifikanten Bakteriurie. Dtsch. med. Wschr. 52, 2392 - 2394 (1967)

15. DÖLL, W., REICHEL, G.: Über Vorteile der Vorzählung in einer Zählkammer bei Gesamtkeimzählungen (dargestellt am Beispiel von Clostridium perfringens). Ärztl. Lab. 14, 117 - 122 (1968)

16. FRANKE, H.: Manuskript und Vortrag. G. Thieme-Verlag, Stuttgart (1969)

17. FISCHER, G.W., LICHT, W.: Über die Beurteilung der Pathogenität von Urinkeimen. Dtsch. med. Wschr. 82, 346 - 348 (1957)

18. FUCHS, T., GUTENSOHN, G.: Gezielte antibakterielle Therapie durch chronischen Pyelonephritis und deren derzeitige bakteriologische Grundlage. Med. Welt 43, 2445 (1965)

19. FUCHS, T., GUTENSOHN, G.: Wert und Grenzen des Nitrittests bei der Diagnostik einer Pyelonephritis. Dtsch. med. J. 18, 343 (1967)

20. FUCHS, T.: Pyelonephritis - Diagnostik und Therapie. Boehringer Mannheim GmbH 1969

21. GAYER, J.: Diagnostische und prognostische Probleme bei der Pyelonephritis. Med. Welt 16, 1311 (1965)

22. GEKLE, D.: Zur Therapie der Pyelonephritis im Kindesalter. Dtsch. med. Wschr. 92, 2180 - 2182 (1967)

23. GEKLE, D. FISCHER, V.: Kritische Aspekte zur Pyelonephritis im Kindesalter. Münch. med. Wschr. 109, 1397 - 1405 (1967)

24. HABS, H.
SEELIGER, H.P.R.: Bakteriologisches Taschenbuch.
Joh. Ambrosius Barth, München 1967

25. HASCEK, H.,
PORPACY, P.: Therapie der Harnwegsinfektionen bei Niereninsuffizienz.
Vortrag Urologische Gesellschaft Prag 1966

26. HIRSCH, H.A.,
BLAY, E.: Über quantitative Keimbestimmung bei Harnwegsinfekten.
Münch. med. Wschr. 107, 384 - 388 (1965)

27. HIRSCH, H.A.: Screening-Tests zur Erfassung von Bakterien.
Dtsch. med. Wschr. 95, 1532 - 1536 (1970)

28. HÜBMANN, R.: Pathogenese und Klinik - Diagnostik und Therapie der Pyelonephritis.
Fortschritt der Medizin 82, 8-10/43-46 (1964)

29. HUSSEL, H.: Eine einfache Modifikation zur genauen Bestimmung der Keimzahl bei der bakteriologischen Urinuntersuchung.
Med. Lab. 22, 1 (1969)

30. KASS, E.H.: Pyelonephritis and bacteriuria, a major problem in preventive medicine.
Ann. intern. med. 56, 46 (1962)

31. KINCAID-SMITH, M.,
BULLEN, M.,
FUSSEL, U., MILLS, J.
HUSTEN, W.: The reliability of screening tests of bacteriuria in pregnance.
Lancet II, 61 - 62 (1964)

32. KUNIN, C.M.: Asymptomatic bacteriuria.
Ann. Rev. Med. 17, 383 (1966)

33. LINNEWEH, G.: Zur Klinik der Harnwegsinfektionen I.
Dtsch. med. Wschr. 82, 365 - 372 (1957)

34. LINNEWEH, G.: Zur Klinik der Harnwegsinfektionen I I.
Dtsch. med. Wschr. 82, 438 - 442 (1957)

35. LINZENMEIER, G.,
MÜLLER, R.: Die Bedeutung der Griesschen Nitritprobe bei Harnwegsinfektionen.
Klin. Wschr. 41, 919 - 921 (1963)

36. LINZENMEIER, G.: Probleme der bakteriologischen Urindiagnostik.
Dtsch. med. Wschr. 90, 1143 - 1145 (1965)

37. LINZENMEIER, G.: Diagnostik und Chemotherapie der Harnwegsinfektionen aus der Sicht des Bakteriologen.
n+m 3, 56 - 63 (1966)

38. LINZENMEIER, G.: Mikrobiologische Harnanalyse - Grundlagen einer gezielten antibakteriellen Therapie der Pyelonephritis.
Therapeutische Berichte 2, 91 - 94 (1967)

39. LODENKÄMPER, H.: Keimzählungsmethode mit gleichzeitigem Nachweis von sporenfreien Anaerobiern im Urin.
Ärztl. Lab. 15, 360 - 363 (1969)

40. MALKEY, H.P., SANDYS, G.H.: Diagnosis of urinary infections.
Brit. med. J. 1, 1173 (1966)

41. MERRILL, J.A., COLMORE, J.P., WILKERSON, R.G., BRADEN, B.F., DESHAN, P.W.: Screening for asymptomatic bacteriuria during antepartum care.
Am. J. Obstet. Gynec. 99, 216 (1967)

42. METZ, H.: Zur Bakteriologie, Therapie und Pathogenese nicht gonorrhoischer Harnwegsinfektionen.
Münch. med. Wschr. 105, 457 - 462 (1963)

43. MICHALEK, H., MÜLLER, H., ARNOLD, K.: 100 000 Bakterien pro ml Urin - signifikante Bakteriurie.
Dtsch. Ärztebl. 33, 2286-2289 (1969)

44. MÖSSNER, G., CACA, A., THELEN, A., SCHIRMEISTER, J., MAURER, H.: Grundlagen für eine gezielte Chemotherapie der chronischen Pyelonephritis.
Urol. 8, 2 - 9 (1969)

45. NAUMANN, P.: Bakteriologische Aspekte der Pyelonephritis.
Dtsch. med. J. 15, 434 - 437 (1964)

46. PERCIVAL, A.: Serum-Antiboda levels as an indication of clinically inapparent Pyelonephritis.
Lancet II, 1027 - 1033 (1964)

47. PETUELY, F., LINDNER, G.: Kritische Untersuchungen über die Darmflora.
Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 195, 347 - 384 (1964)

48. PFLAUMER, E.: Anreicherungskammer zur mikroskopischen Harnuntersuchung.
Münch. med. Wschr. 67, 1385 - 1386 (1920)

49. RINGELMANN, R., HADDING, U., BITTER-SUERMANN, D.: Die bakteriologische Keimzählung im Urin.
Ärztl. Lab. 14, 471 - 476 (1968)

50. TOBLER, L., ZOLLER, L.: Vergleich der Keimzahlbestimmungen Uricult - Gußplatte. D. Med. Lab. 22, 214 - 217 (1969)

51. SARRE, H.: Lehrbuch der Nierenkrankheiten. Thieme, Stgt. 1967

52. SANDER, J., BLASIUS, C.: Untersuchungen über die Wirksamkeit von Gentamycin gegen bestimmte gramnegative Stäbchen. Dtsch. med. Wschr. 93, 1401 - 1404 (1968)

53. SCHEITLIN, W.: Methodik und diagnostische Bedeutung der quantitativen Urinkultur. Dtsch. med. Wschr. 92, 163 - 164 (1967)

54. SCHMID, W.: Erreger von Harnwegsinfektionen und deren Empfindlichkeiten gegen Antibiotika und Chemotherapeutika. Med. Welt 22, 2131 (1966)

55. SCHREIBER, W.: Pyelonephritis und Bakteriurie während der Schwangerschaft. Med. Welt 24, 1329 - 1333 (1964)

56. SIEGEL, C.: Diagnose und Therapie der Pyelonephritis. Med. Klin. 61, 1537 - 1542 (1966)

57. SIEGEL, C.: Quantitative Bakteriendiagnostik als Therapiekontrolle der Pyelonephritis. Med. Welt 2, 124 - 131 (1968)

58. STEERS, E., JACKSON, F.: A test for bacteriuria. Lancet I, 1267 (1963)

59. SIMMONS, N.A., WILLIAMS, J.D.: A simple test for significant bacteriuria. Lancet I, 1377 - 1378 (1962)

60. STEHR, K.: Zur Methodik und Bedeutung der Keimzahlbestimmung bei kindlichen Harnwegsinfektionen. Vortrag gehalten am 31.5.1969 anläßlich der Tagung der Süddeutschen Kinderärzte in Pforzheim (URICULT-Referate)

61. SZABO, M., SOMOLO, G., SEEP, J.: Beiträge zur Frage der quantitativen Urinbakteriologie. Z. ges. inn. Med. 21, 753 (1966)

62. UHLECKE, H., POETSCHKE, G.: Keimzählung und Ermittlung von Absterbevorgängen mit Hilfe von Membranfilterverfahren. Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 168, 141 - 151 (1957)

63. WILDBOLZ, E.: Die Pyelonephritis. Dtsch. med. Wschr. 87, 2509 - 2514 (1962)

64. WICHMANN, G., ASSMUS, D.: Die Bakteriurie aus der Sicht der Bakteriologen. Dtsch. med. Wschr. 93, 1947-1954 (1968)

65. WILLE, L., WINTER, J.: Erfahrungen mit einer einfachen Methode zur quantitativen Keimbestimmung aus dem Urin. Dtsch. med. Wschr. 94, 2223 - 2226 (1969)

66. WILLE, L., WINTER, J., BICKEL, H.: Erste Erfahrungen mit einem einfachen Kulturverfahren zur quantitativen Keimbestimmung aus dem Urin. Vortrag gehalten am 31.5.1969 anläßlich der Tagung der Süddeutschen Kinderärzte in Pforzheim (URICULT-Referate)

67. WISSENSCHAFTLICHE TABELLEN - DOCUMENTA GEIGY Hrsg., J.R. Geigy A.G., Basel 1969

LEBENSLAUF

Ich wurde am 18. 7. 1946 in Birkenhügel in Thüringen geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Aschaffenburg, wo mein Vater als praktischer Arzt tätig ist. In dieser Stadt besuchte ich von 1952 - 1956 die Volksschule, und anschließend das humanistische Kronberg-Gymnasium.

1965 begann ich nach bestandenem Abitur an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg mit dem Studium der Medizin. Nach zwei Semestern legte ich die naturwissenschaftliche, nach dem 5. vorklinischen Semester 1968 die ärztliche Vorprüfung ab. Im Sommersemester 1971 schloß ich mein Studium mit dem Medizinischen Staatsexamen ab.

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit "Bakteriologische Untersuchungen zum Vergleich von Methoden zur Keimzahlbestimmung in Harnproben" selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere ferner, daß ich außer dem vorliegenden Thema keine anderen Dissertationsthemen bearbeitet habe.

Heidrun Rettenbacher

Offset-Druck Gugel, Würzburg
Marcusstraße 10

Offset-Druck Gugel, Würzburg
Marcusstraße 10